

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ (ภาษาไทย) ชีววิทยาของเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทและการรักษาโรคระบบประสาท
ด้วยเซลล์ต้นกำเนิดบำบัด
(ภาษาอังกฤษ) **Neural Stem Cell Biology and Stem Cell Therapy in Neurological
Disorders**

คณะผู้วิจัย สังกัด

ชื่อหัวหน้าโครงการ (ภาษาไทย) ศาสตราจารย์ นายแพทย์นิพนธ์ พวงวรินทร์
(ภาษาอังกฤษ) Prof. Dr. Niphon Pongvarin, MD.,
(ตำแหน่งวิชาการ) ศาสตราจารย์

ที่ทำงาน

สาขาวิชาประสาทวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
โทรศัพท์ 02-419-7101-2 โทรสาร 02-412-3009, 02-412-2400

E-mail address: sinpg@mahidol.ac.th, niphonp.thailand@gmail.com

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ชื่อนักวิจัยร่วมโครงการ

1. อ.นพ. ยงชัย นิละนนท์ (Dr. Yongchai Nilanont)
สาขาวิชาประสาทวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
โทรศัพท์ 02-419-7101-2 โทรสาร 02-411-1103 E-mail: ynilanon@gmail.com
2. อ.พญ.กนกวรรณ บุญญพิสิฏฐ์ (Dr. Kanokwan Boonyapisit)
สาขาวิชาประสาทวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
โทรศัพท์ 02-419-7101-2 โทรสาร 02-411-1103 E-mail: sikby@mahidol.ac.th
3. รศ.นพ.พิพัฒน์ เชี่ยววิทย์ (Assoc. Prof. Dr.Pipat Chiewvit)
สาขาวิชารังสีวินิจฉัย ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
โทรศัพท์ 02-419-8603 โทรสาร 02-417-7089 E-mail: pipat8999@yahoo.com
4. พญ.พัชรารัตน์ รงค์วารโรจน์ (Dr. Patcharawadee Rongwarroj)
สาขาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
โทรศัพท์ 02-419-7000 ต่อ 4448-50 โทรสาร 02-411-2012, 02-409-4040
E-mail: Rongwarroj@yahoo.com
5. นพ.ทรงชัย ชินวัฒน์กุล (Dr. Songchai Chinwattanakul)
สาขาวิชาประสาทวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
โทรศัพท์ 02-419-7101-2 โทรสาร 02-411-1103
6. นพ.สรรเสริญ ลิ้มสุนทรกุล (Dr. Sunsern Limsoontarakul)
สาขาวิชาประสาทวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
โทรศัพท์ 02-419-7101-2 โทรสาร 02-411-1103
7. ดร.จุฬาลักษณ์ โกมลตรี (Dr. Chulalak Komontri)
สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
โทรศัพท์ 02-4197000 ต่อ 6622 โทรสาร 02-411-0155 E-mail: sickt@mahidol.ac.th
8. นพ.เพิ่มพันธุ์ ธรรมสโรช (Dr. Permpan Dhammasaroj)
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
โทรศัพท์ 02-201-5422 E-mail: tepdm@mahidol.ac.th
9. ดร.ไกร มีมล (Dr. Krai Meemon)
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
โทรศัพท์ 02-201-5422 E-mail: sckmm@mahidol.ac.th

10. นางสาวเยาวลักษณ์ อุ่ปรัชญา (Ms. Yaowalak U-pratya)
สาขาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
โทรศัพท์ 02-4197000 ต่อ 4446 โทรสาร 02-4112012, 02-4094040
E-mail: simyy@mahidol.ac.th
11. นางสาวมณีเทพ ยิ้มแย้ม (Ms. Maneenop Yimyam)
สาขาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
โทรศัพท์ 02-4197000 ต่อ 4446 โทรสาร 02-4112012, 02-4094040
12. นางสาวสิริขวัญ บุญเหมาะ (Ms. Sirikwan Boonmoa)
สาขาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
โทรศัพท์ 02-4197000 ต่อ 4448-50 โทรสาร 02-4112012, 02-4094040
E-mail: tesbo@mahidol.ac.th

ชื่อที่ปรึกษา (ภาษาไทย) ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุรพล อิศรไกรศีล
(ภาษาอังกฤษ) Prof. Dr. Surapol Issaragrisil, MD.

ที่ทำงาน

สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
โทรศัพท์ 02-419-4448-50 โทรสาร 02-411-2012, 02-409-4040
E-mail address: sisis@mahidol.ac.th, surapolsi@gmail.com

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สัญญาเลขที่ DBG4980014

โครงการ : ชีววิทยาของเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทและการรักษาโรคระบบประสาทด้วยเซลล์ต้นกำเนิดบำบัด
รายงานสรุปการดำเนินงานในรอบ 3 ปี

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 2 8 กันยายน 2552 ถึงวันที่ 19 กรกฎาคม 2554
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ศาสตราจารย์นายแพทย์นิพนธ์ พวงวรินทร์
หน่วยงาน : คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

1. การดำเนินงาน (ดำเนินงานตามแผนงานที่ได้วางไว้ทุกประการ)

ขอส่งรายงานที่ได้ดำเนินการมาทั้งหมด ตลอดเวลา 3 ปี ซึ่งแบ่งเป็นโครงการวิจัยย่อย 3 เรื่อง และ ช่วงขาดเงินวิจัยเกือบ 2 ปี (28 กันยายน 2552 ถึงวันที่ 19 กรกฎาคม 2554) และทางโครงการวิจัยได้เขียน manuscript เพื่อเตรียมส่งตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ 2 เรื่อง ดังที่แนบมาด้วย

2. สรุปผลการดำเนินงาน

โครงการชีววิทยาของเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทและการรักษาโรคระบบประสาทด้วยเซลล์ต้นกำเนิดบำบัด (Neuro Stem Cell Biology and Stem Cell Therapy in Neurological Disorders) ที่ได้ ดำเนินการวิจัยตลอดเวลา 3 ปีที่ผ่านมาได้สรุปผลและแยกเป็นโครงการวิจัยย่อยๆ ได้ 3 โครงการ พร้อมทั้ง ได้แนบรายละเอียดมาด้วย 3 เรื่อง คือ

1. การแยกและการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Mesenchyme ที่ได้จาก umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta ในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ประสาท (Isolation, Characterization and Neural Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells derived from umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion and Placenta)

2. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) for the Treatment of Acute Ischemic Stroke

3. Control Trial of STEM Cell Transplantation in Amyotrophic Lateral Sclerosis (STEM-ALS)

3. ท่านได้พบอุปสรรคในการดำเนินงานหรือไม่ ถ้าพบกรุณาระบุว่ามีอะไรบ้าง และได้แก้ไขอย่างไรบ้าง

1 . ยังไม่ได้รับเงินวิจัยงวดที่ 5, 6, 7 โดยไม่ทราบเหตุผลว่าทำไมจึงไม่ได้เงินวิจัยในงวดดังกล่าว แม้ ได้เคยสอบถามหลายหนก็ไม่ได้คำตอบจาก สกว.

2 . จำนวนเงินที่ขออนุมัติเบิกคือ งวดที่ 5 จำนวนเงิน 672,440 บาท, งวดที่ 6 จำนวนเงิน 484,360 บาท, งวดที่ 7 จำนวนเงิน 90,000 บาท, รวม 1,246,800 บาท

รูปแบบ Abstract (บทคัดย่อ)

ชื่อโครงการ การแยกและการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Mesenchyme ที่ได้จาก umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta ในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ประสาท

(Isolation, Characterization and Neural Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells derived from umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion and Placenta)

Mesenchymal stem cell (MSCs) จัดเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Adult stem cell ที่พบในไขกระดูก ร่วมกับ Hematopoietic stem cells (HSCs) MSC มีจำนวนประมาณ 0.001-0.01% ของจำนวนเซลล์ทั้งหมดในไขกระดูก (Pittenger, 1999) MSCs สามารถที่จะนำมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และสามารถพัฒนาเป็นเซลล์ได้หลายชนิด อาทิเช่น เซลล์กระดูก (Pittenger, 1999; Quirici, 2002; Kern, 2006), เซลล์กระดูกอ่อน (Quirici, 2002) เซลล์ไขมัน (Pittenger, 1999; Quirici, 2002; Kern, 2006 และ เซลล์ประสาท (Kim, 2006) ปัจจุบันมีการนำ MSCs มาใช้ในการปลูกถ่ายร่วมกับ HSCs โดยมีหลักฐานบ่งชี้ว่า MSCs สามารถช่วยให้การ engraft เนื้อเยื่อของ HSCs ดีขึ้น (Horwitz, 1999; Liechty, 2000; Fouillard, 2007) รวมทั้งยังสามารถช่วยลดการเกิด Graft versus host disease (GVHD) ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูกอีกด้วย (Le Blanck, 2003; Ringden, 2006) อย่างไรก็ตามการแยก MSCs จากไขกระดูกเพื่อนำมาใช้ในการปลูกถ่ายดังกล่าวมีความยุ่งยากต้องใช้ทักษะและความชำนาญอย่างสูงและต้องเจาะไขกระดูกผู้บริจาค ด้วยเหตุนี้การศึกษาเพื่อหาวิธีการแยก MSCs จากแหล่งอื่นๆจึงมีความสำคัญ

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่านอกจากไขกระดูกจะเป็นแหล่งของ MSC แล้วยังสามารถแยก MSC ได้จากแหล่งอื่นได้แก่ เนื้อเยื่อสายสะดือ (umbilical cord) Wharton's jelly และ เส้นเลือดสายสะดือ (umbilical vein) (Tondreau, 2005) การแยก MSC จากแหล่งดังกล่าวมีข้อดีคือสามารถทำได้สะดวกและไม่ต้องเจาะไขกระดูก อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยง MSC จาก umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta ยังมีปัญหาการปนเปื้อน จากเซลล์ชนิดอื่นๆ ในปริมาณค่อนข้างมาก

นอกจากนี้การศึกษเปรียบเทียบคุณสมบัติของ MSC ที่แยกได้จากแหล่งอื่นๆ ดังกล่าวยังมีน้อยมาก ด้วยเหตุนี้ การพัฒนาวิธีการแยก MSC จาก umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta รวมทั้งการศึกษเปรียบเทียบ คุณสมบัติของ MSC ที่แยกได้จากแหล่งดังกล่าว ทั้งในแง่ความสามารถในการแบ่งตัว เพิ่มจำนวน และ ความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็น เซลล์กระดูก เซลล์กระดูกอ่อน เซลล์ไขมัน และ เซลล์ประสาทจึงมีความสำคัญ

วัตถุประสงค์ของโครงการ

วัตถุประสงค์ทั่วไป

เพื่อแยกและศึกษาคุณสมบัติ ของ MSCs ที่ได้จาก umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta

วัตถุประสงค์เฉพาะ

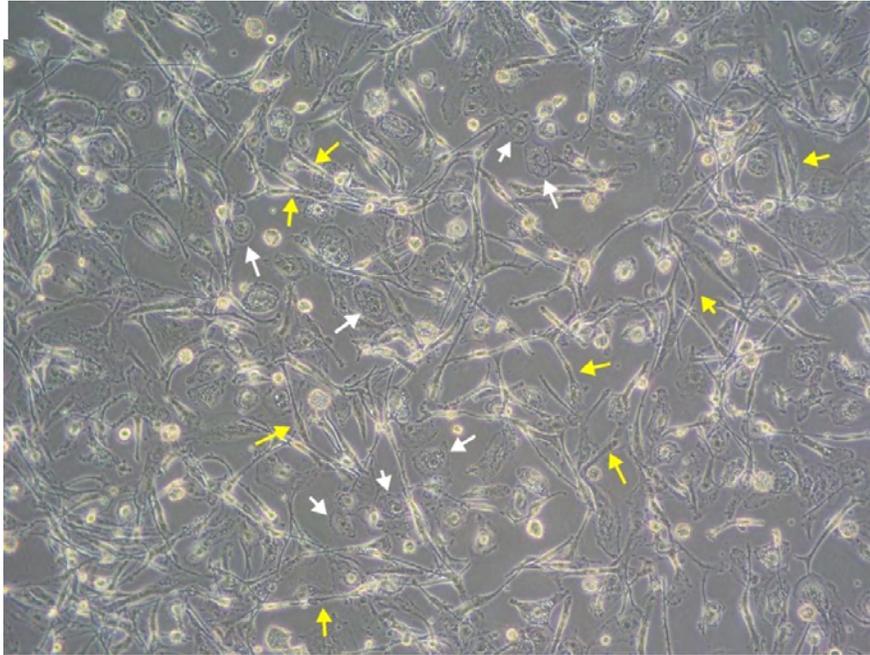
1. เพื่อศึกษาวิธีการแยก MSCs ที่ได้จาก umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลบนพื้นผิวเซลล์ (CD90, CD73, CD105, CD106) ของ MSCs ที่แยกจาก umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta เปรียบเทียบกับ MSCs ในไขกระดูก
3. เพื่อศึกษาความสามารถในการพัฒนาเป็นเซลล์กระดูกและเซลล์ไขมัน ของ MSCs ที่แยกได้จาก umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta เปรียบเทียบกับ MSCs ในไขกระดูก
4. เพื่อศึกษาความสามารถในการพัฒนาเป็นเซลล์ประสาทของ MSCs ที่แยกได้จาก umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta เปรียบเทียบกับ MSCs ในไขกระดูก

ผลการทดลอง

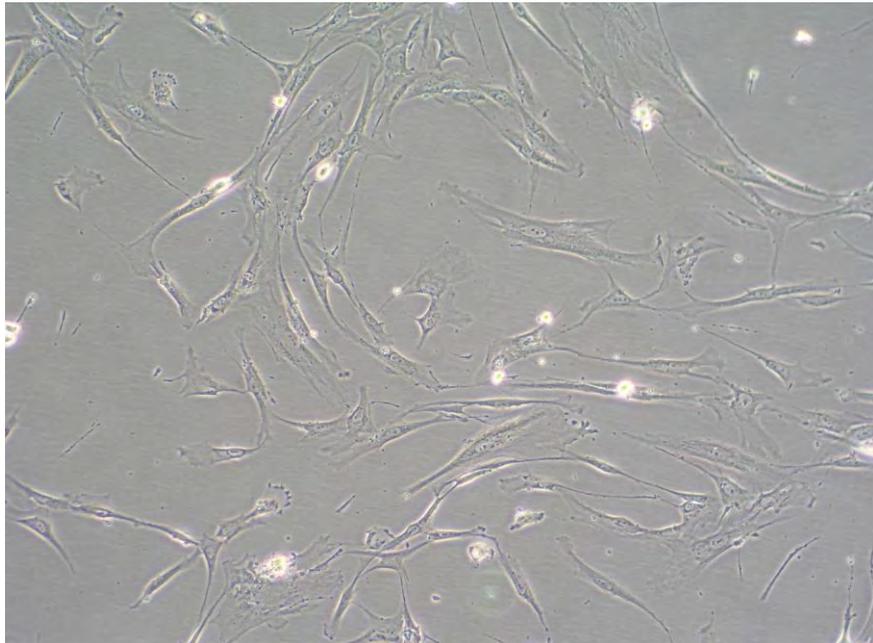
1. คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการแยก MSCs จาก umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta

ผู้วิจัยนำเนื้อเยื่อ umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta มาแยกเป็น single cell ด้วยวิธี enzyme digestion หลังจากได้ single cell suspension จำนวน 5×10^7 เซลล์ นำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงต่อใน 6-well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM)+10% (v/v) Fetal bovine serum (FBS) โดยทำการ seed cell ที่ความหนาแน่น 1.5×10^6 cells/cm² หลังจากเลี้ยง MNCs ได้ประมาณ 12 วัน จะพบเซลล์ลักษณะคล้ายกระสวย (spindle-shaped cells) (ลูกครีสีเหลือง) เซลล์ชนิดที่สองมีลักษณะกลมใหญ่ (ลูกครีสีขาว) (รูปที่ 1A) โดย spindle-shaped cells ที่ได้มีลักษณะใกล้เคียงกับ MSCs ที่แยกได้จากไขกระดูก (รูปที่ 1B) ทั้ง spindle-shaped cells (ลูกครีสีเหลือง) และ osteoclast-like cells (ลูกครีสีขาว) ยังคงมีรูปร่างและอัตราส่วนเช่นเดิมภายหลังการ subculture 3 ครั้ง (รูปที่ 2)

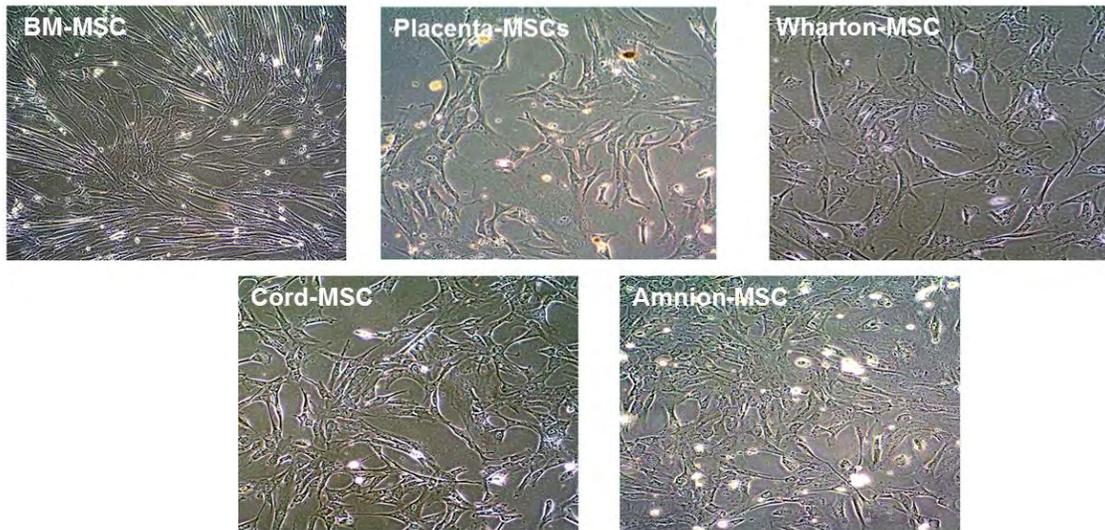
A



B



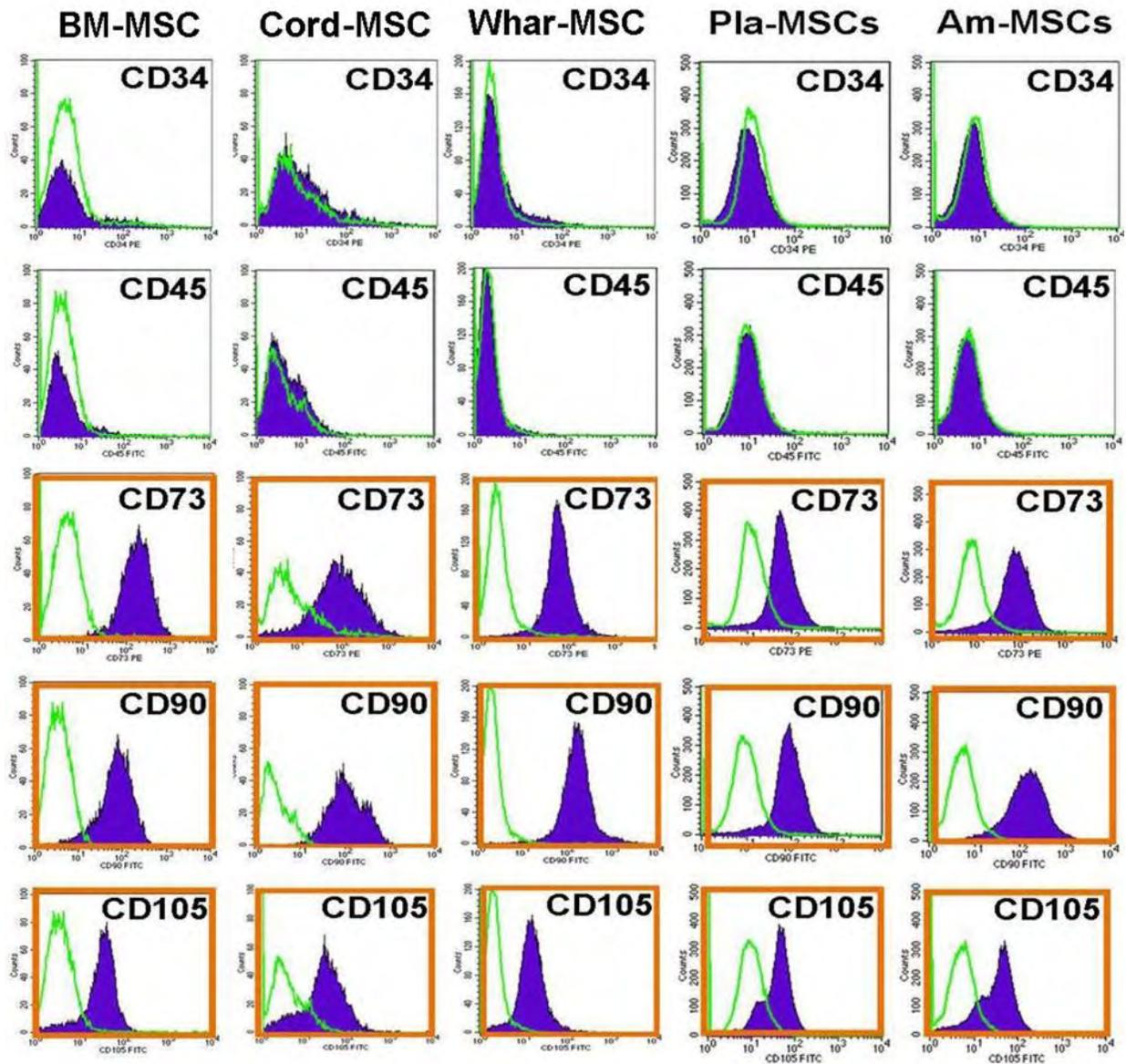
รูปที่ 1 ลักษณะของเซลล์ที่แยกจาก umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 12 วัน (รูป A กำลังขยาย 100 เท่า) รูป B แสดงลักษณะของ MSC ที่แยกได้จากไขกระดูก (รูป B กำลังขยาย 200 เท่า)



รูปที่ 2 ลักษณะของเซลล์ที่แยกจาก umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta หลังการเลี้ยงและเพิ่มจำนวนไป 3 passages

2. MSCs ที่สกัดได้จาก umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta มีการแสดงออกของโมเลกุลบนพื้นผิวเซลล์ในรูปแบบที่เหมือนกับ MSC ที่สกัดได้จากไขกระดูก

คณะผู้วิจัยทำ การศึกษาคุณลักษณะทางด้านการแสดงออกของโมเลกุลบนพื้นผิวเซลล์ ของ MSCs ที่แยกได้จากไขกระดูก umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta โดยใช้ flow cytometer พบว่า MSCs ที่แยกได้จาก 2 แหล่งดังกล่าวมีการแสดงออกของโมเลกุลบนพื้นผิวเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อ MSCs คือ CD90 (Thy-1), CD105 (SH2) และ CD73 โดยไม่มีการแสดงออกของโมเลกุลบนพื้นผิวเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อ HSCs (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 การแสดงออกของโมเลกุลบนพื้นผิวเซลล์ ของ MSCs ที่สกัดได้จากไขกระดูก umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta

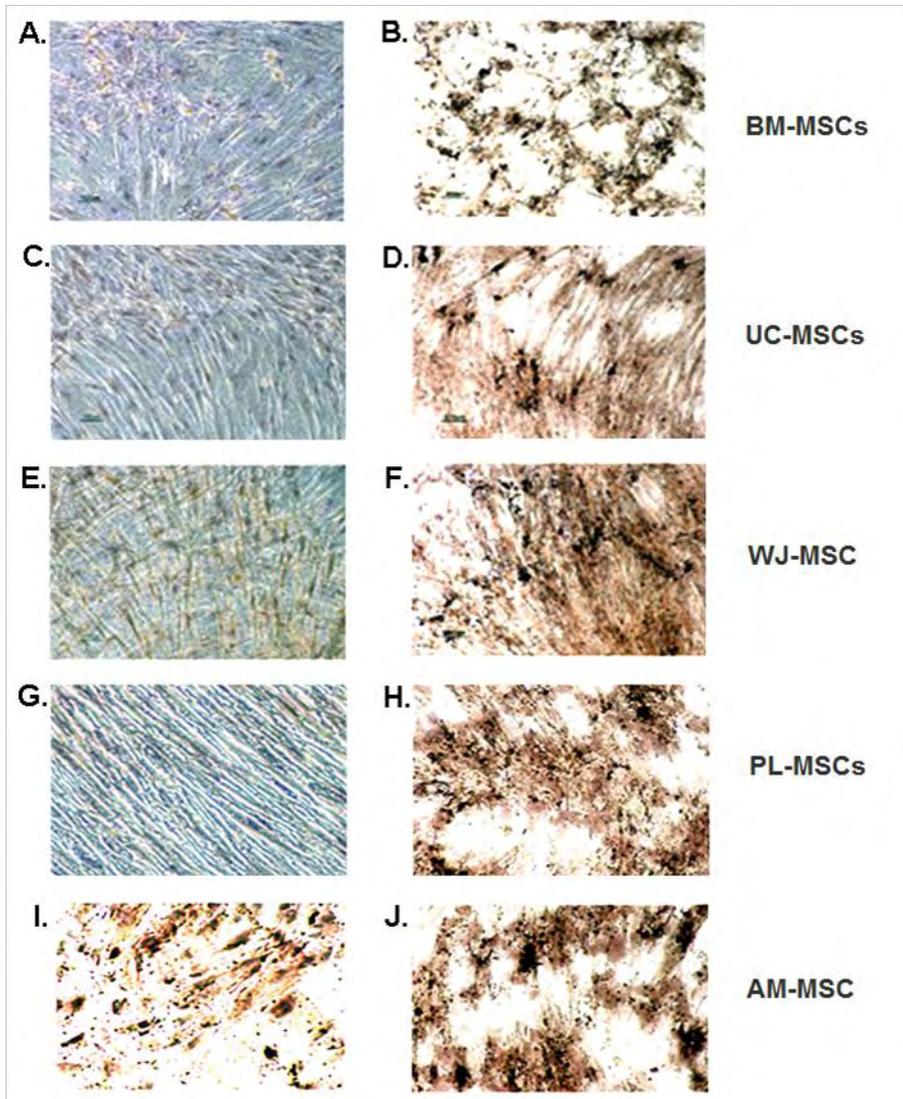
3. ศึกษาความสามารถในการพัฒนาเป็นเซลล์กระดูก เซลล์ไขมัน และ เซลล์ประสาท ของ MSCs ที่แยกได้จากไขกระดูก umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta เปรียบเทียบกับ MSC ในไขกระดูก

ผู้วิจัยพบว่า MSCs ที่แยกได้จาก umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta มีความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็น เซลล์กระดูก (รูปที่ 4) และ เซลล์ไขมัน (รูปที่ 5) ภายหลังจากนำมาเพาะเลี้ยงในน้ำยาที่มีความจำเพาะเช่นเดียวกับ MSCs ที่แยกได้จาก ไขกระดูก

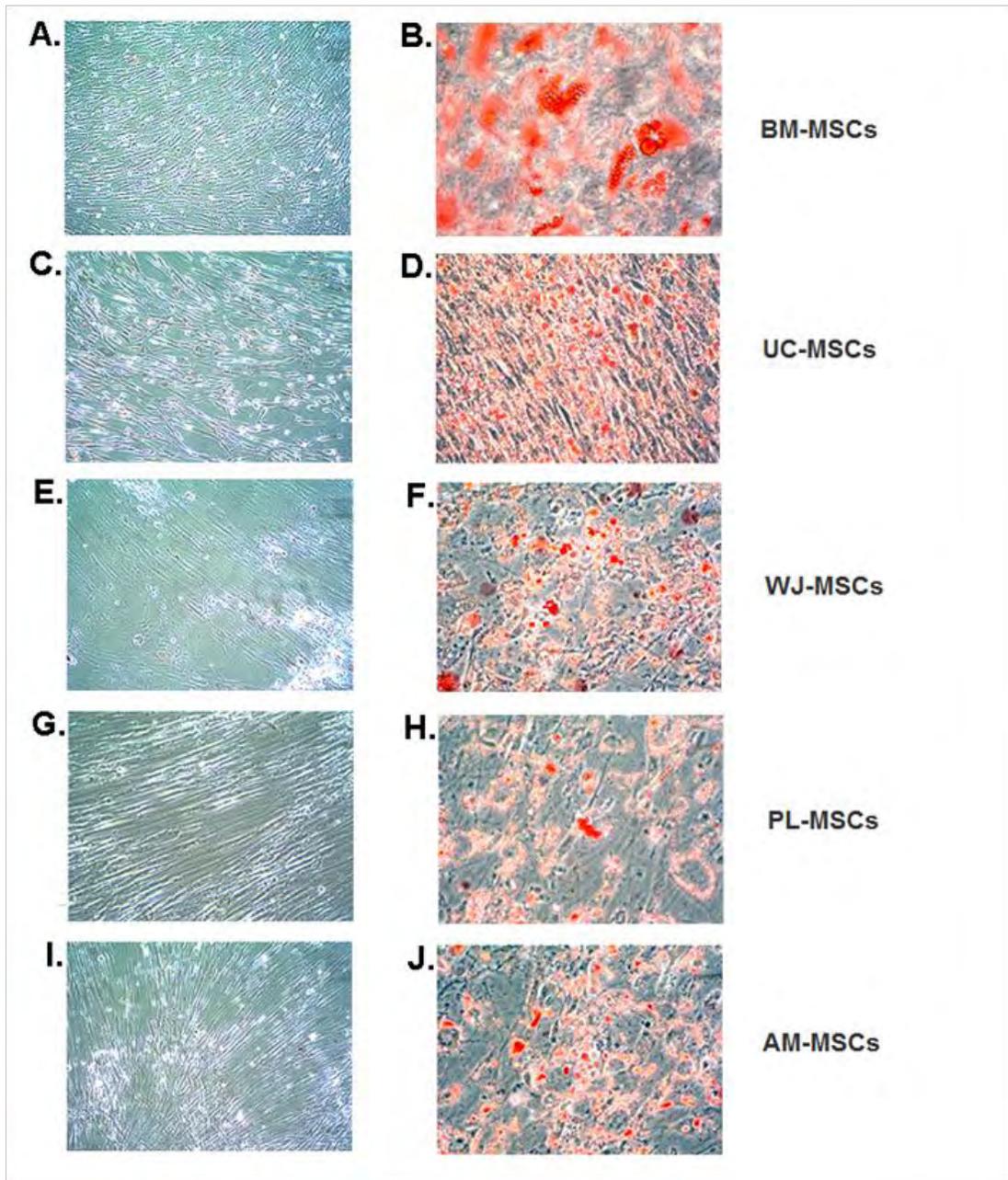
นอกจากนี้ยังพบว่า ภายหลังจากได้รับการเหนี่ยวนำ AM-MSCs สามารถเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ประสาททั้งทางด้านรูปร่างและการแสดงออกของ neural markers คือ MAP-2, GFAP และ β -tubulin III ทั้งในระดับ RNA และ โปรตีน

ข้อสรุป

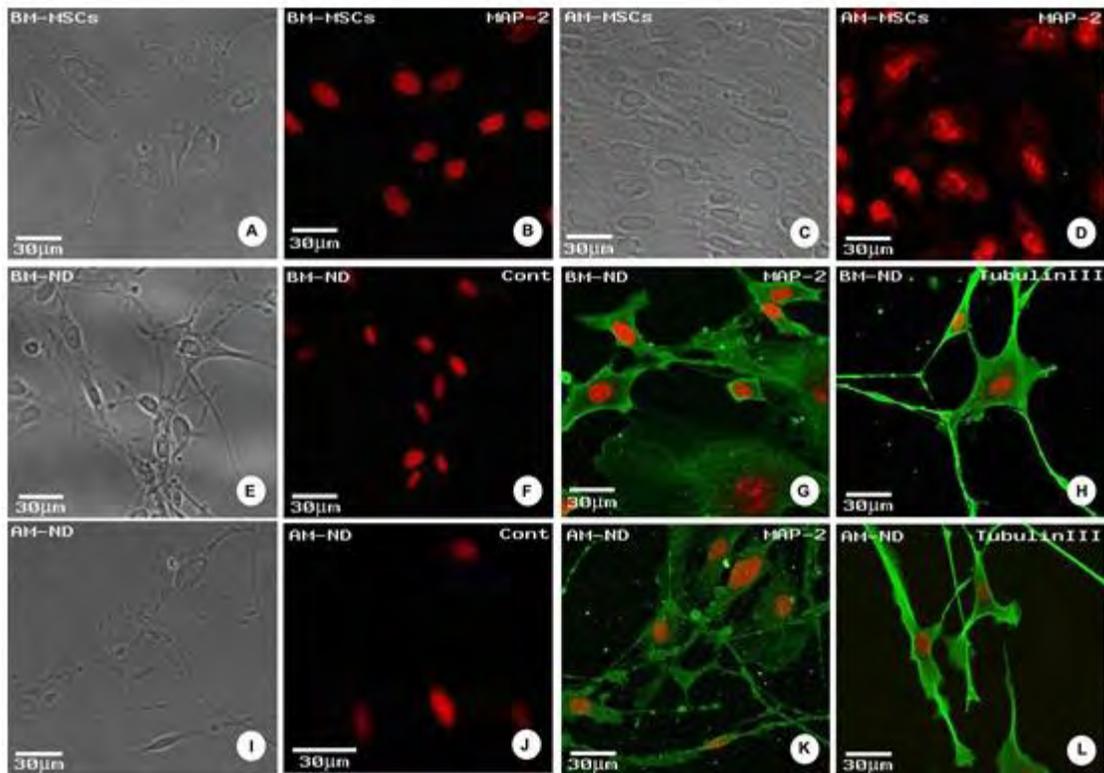
จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าใน umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta มีเซลล์ที่มีคุณสมบัติของ MSCs อยู่ ด้วยเหตุผลดังต่อไปนี้ 1) UC-MNCs, WJ-MSCs, AM-MSCs และ PL-MSCs มีการแสดงการออกของ MSCs marker ทั้ง CD 90, CD 73 และ CD105 2) UC-MNCs, WJ-MSCs, AM-MSCs และ PL-MSCs มีความสามารถในการเกิดโคโลนีที่มีลักษณะคล้าย MSCs 3) UC-MNCs, WJ-MSCs, AM-MSCs และ PL-MSCs มีความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็น เซลล์กระดูก เซลล์ไขมัน และ เซลล์ประสาทได้เช่นเดียวกับ MSC ที่แยกได้จากไขกระดูก จึงสรุปได้ว่า UC-MNCs, WJ-MSCs, AM-MSCs และ PL-MSCs ดังกล่าวมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ MSC ที่แยกได้จากไขกระดูกและน่าจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางคลินิกเพื่อทดแทน MSC ที่แยกได้จากไขกระดูก ในอนาคต



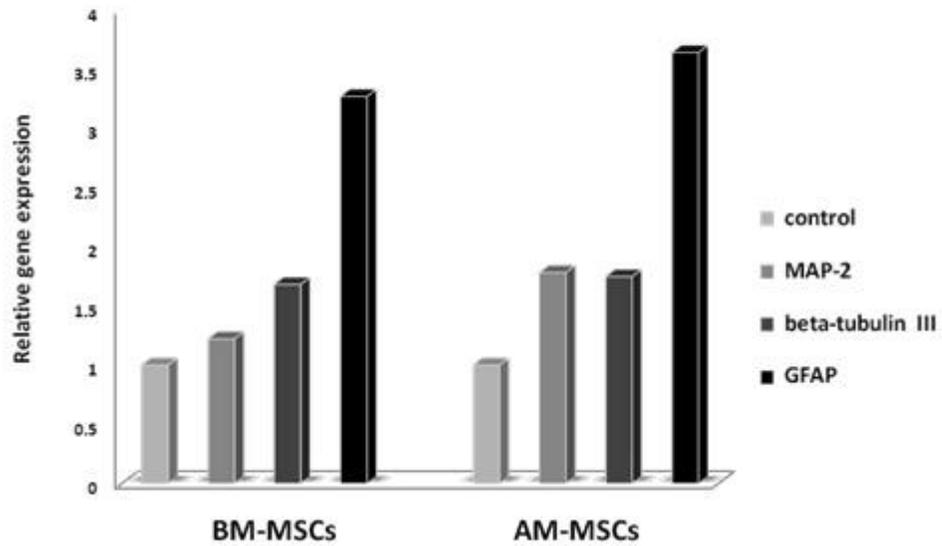
รูปที่ 4 ความสามารถในการเจริญพัฒนาของ MSCs ที่แยกได้จาก ไชกระดูก umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta ไปเป็นเซลล์กระดูก (A, C, E, G, I) MSCs ที่ไม่ถูก induced ด้วย OsteoDiff medium และย้อมด้วย Alkaline phosphatase (B, D, F, H, J) BM-MSCs ที่ได้รับการ induced ด้วย OsteoDiff medium และย้อมด้วย Alkaline phosphatase



รูปที่ 5 ความสามารถในการเจริญพัฒนาของ MSCs ที่แยกได้จาก ไช้กระดูก umbilical cord, Wharton's jelly, Amnion, และ Placenta ไปเป็นเซลล์ไขมัน (A, C, E, G, I) MSCs ที่ไม่ถูก induced ด้วย AdipoDiff medium และย้อมด้วย Oil red-O (B, D, F, H, J) BM-MSCs ที่ได้รับการ induced ด้วย AdipoDiff medium และย้อมด้วย Oil red-O



รูปที่ 6 ความสามารถในการเจริญพัฒนาของ MSCs ที่แยกได้จาก Amnion และ ไชกระดุก ไปเป็นเซลล์ประสาท (A, C) MSCs ที่ไม่ถูก induced ด้วย Neural differentiation medium (B, D) MSCs ที่ไม่ถูก induced ด้วย Neural differentiation medium ไม่มีการแสดงออกของ neural marker MAP-2 (F, J) MSCs ที่ไม่ถูก induced ด้วย Neural differentiation medium ไม่มีการแสดงออกของ neural marker β -Tubulin III (E, I) MSCs ที่ถูก induced ด้วย Neural differentiation medium มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายเซลล์ประสาท (G, K) MSCs ที่ถูก induced ด้วย Neural differentiation medium มีการแสดงออกของ neural marker MAP-2 (H, L) MSCs ที่ถูก induced ด้วย Neural differentiation medium มีการแสดงออกของ neural marker β -Tubulin III



รูปที่ 7 Quantitative real-time PCR ตรวจพบการแสดงออกของ neural specific mRNA, MAP-2, β -tubulin III and GFAP ใน BM-MSCs และ AM-MSCs ที่ถูก induced ด้วย Neural differentiation medium เป็นเวลา 3 วัน

Control trial of STEM Cell Transfusion in Amyotrophic Lateral Sclerosis (STEM-ALS)

Sunsern Limsoontarakul,MD¹, Niphon Pongvarin,MD, FRCP,¹ Naris Samitasin,MD¹, Surapol Isarakrisil,MD,² Patcharawadee Rongwararaj,MD², Pipat Chiewit,MD³, Chulalak Komontri,PhD, Kanokwan Boonyapisit,MD¹.

Division of Neurology, Department of Medicine¹; Division of Hematology, Department of Medicine², Department of Diagnostic Radiology³, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand.

Keywords: Amyotrophic lateral sclerosis, Motor neuron disease, Stem cell transplantation

Corresponding author:

Kanokwan Boonyapisit, M.D.

Division of Neurology, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital,
2 Prannok Road, Bangkoknoi, Bangkok, Thailand 10700

Tel +66 2 4197101-2

Fax +66 2 4123009

Email: - sikby@mahidol.ac.th

Control trial of STEM Cell Transfusion in Amyotrophic Lateral Sclerosis (STEM-ALS)

Aim: To study the efficacy and safety of stem cell transfusion via cerebral angiogram in patients with ALS

Study design: Randomized, double blinded, controlled trial

Method: ALS patients attended the neurology clinic at Siriraj Hospital were enrolled from August 2007 – April 2009 according to the inclusion and exclusion criteria. The patients then were randomized and assigned to the stem cell transfusion group and placebo group at a ratio of 2:1. Bone marrow was harvested from both iliac crests in the operating room and stem cells were extracted from the specimen. 20 ml of extracted stem cells were then infused via angiogram at an affected segment of spinal cord (anterior spinal artery) and/ or brain stem (vertebral artery). An equal volume of patient's plasma was infused in the placebo group.

All enrolled patients were assessed by examiners at baseline, 2,4,8 and 12 months after stem cell transfusion. Assessment included the maximal voluntary isometric contraction (MVIC) of different muscle groups, % predicted force vital capacity, and ALS Functional Rating Scale-Revised (ALSFRS-R) scores for each visit. Patients were also monitored for possible adverse events during all visits.

Results: Total of 25 ALS patients were included in the study. 17 patients were randomized to receive stem cell transfusion and 8 patients were randomized to receive placebo as a control group. Only 8 (47.1%) and 2 (25%) subjects completed all assessments according to the protocol at 12-month follow-up visit in SCT group and placebo group, respectively. However, 11 (64.7%) and 6 (75%) subjects were able to complete the ALSFRS at 12-month follow up visit (interviewed via the telephone).

At 12 months, arm megascore as well as leg megascore, grip megascore, % predicted FVC, and ALSFRS-R declined at the non-significantly different rates. There was also no difference in days to survival end and the all-cause mortality between the two groups. No difference in prevalence of adverse effects was observed between the treatment group and the control group.

Although this study has failed to demonstrate any beneficial effects of stem cell transfusion for treatment of patients with ALS, the study might provide another method of stem cell delivery to the target sites for further trials of stem cells in ALS patients.

การศึกษาประสิทธิภาพของการฉีดเซลล์ต้นกำเนิดเข้าในหลอดเลือดบริเวณไขสันหลังในผู้ป่วยโรคเซลล์ประสาทไขสันหลังเสื่อม (amyotrophic lateral sclerosis)

วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาประสิทธิภาพและความปลอดภัยของการฉีดเซลล์ต้นกำเนิดเข้าในหลอดเลือดบริเวณไขสันหลังในผู้ป่วยโรคเซลล์ประสาทไขสันหลังเสื่อม

วิธีการศึกษา : เป็นการศึกษาแบบ randomized double blinded, controlled trial โดยคัดกรองผู้ป่วยโรค ALS ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลศิริราช ระหว่าง 1 กันยายน 2550 ถึง 1 เมษายน 2552

ผู้ป่วยที่สามารถเข้าเกณฑ์การวิจัยจะถูกสุ่มแบ่งกลุ่มเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการฉีดเซลล์ต้นกำเนิด และกลุ่มเปรียบเทียบที่ไม่ได้รับการฉีดเซลล์ต้นกำเนิดในอัตรา 2:1

ผู้ป่วยกลุ่มศึกษาได้รับการฉีดเซลล์ต้นกำเนิดปริมาณ 20 ลบ.ซม. ซึ่งถูกเตรียมจากเซลล์เม็ดเลือดที่ทำการเจาะจากไขกระดูกเข้าทางหลอดเลือดไขสันหลัง หรือหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงบริเวณก้านสมองผ่านทาง cerebral angiogram ส่วนผู้ป่วยกลุ่มควบคุม ได้รับการฉีดพลาสมาปริมาณเท่ากันเข้าทาง cerebral angiogram ผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มได้รับการตรวจประเมินโดยแพทย์สาขาประสาทวิทยาเมื่อเข้าร่วมการศึกษา และที่ 2, 4, 8 และ 12 เดือนหลังจากได้รับการฉีดเซลล์ต้นกำเนิด โดยแต่ละครั้งของการประเมิน มีการวัดค่า maximal voluntary isometric contraction (MVIC) ของกล้ามเนื้อกลุ่มต่างๆ, % predicted force vital capacity, และ ALS Functional Rating Scale-Revised (ALSFRS-R) และมีการติดตามผลข้างเคียงจากการรักษา

ผลการศึกษา : ได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยทั้งหมด 25 ราย โดยแบ่งเป็นกลุ่มศึกษา 17 ราย และกลุ่มควบคุม 8 ราย เมื่อสิ้นสุดการศึกษาที่ 12 เดือน มีผู้ป่วย 11 ราย(64.7%)จากกลุ่มศึกษา และ 6 ราย(75%) จากกลุ่มควบคุมที่สามารถติดตามประเมิน ALSFRS-R ได้ที่ 12 เดือน แต่มีผู้ป่วยเพียง 8 ราย(47.1%) จากกลุ่มศึกษา และ 2 ราย(25%) จากกลุ่มควบคุมที่สามารถมาตรวจติดตามวัดค่าต่างๆ ได้ครบ

จากการศึกษาพบว่าอัตราการลดลงของ MVIC ของกล้ามเนื้อกลุ่มต่างๆ, % predicted force vital capacity, และ ALS Functional Rating Scale-Revised (ALSFRS-R) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการศึกษาและกลุ่มควบคุมรวมทั้งไม่มีความแตกต่างกันของอัตราการตาย และผลข้างเคียงของการรักษาระหว่างผู้ป่วยสองกลุ่ม

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพและความปลอดภัยของการฉีด เซลล์ต้นกำเนิดเข้าในหลอดเลือดบริเวณไขสันหลังโดยผ่านทาง cerebral angiogram ในผู้ป่วยโรค ALS ถึงแม้จะไม่พบว่าการรักษาที่มีประสิทธิภาพชัดเจน แต่อาจแนวทางหนึ่งในการฉีดเซลล์ ต้นกำเนิดที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หากจะมีการทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการใช้เซลล์ต้น กำเนิดในผู้ป่วย ALS ในอนาคต

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis is a fatal progressive neurodegenerative disorder characterized by selective loss of motor neurons in the motor cortex, brainstem, and spinal cord. Median survival for this condition is normally between 3 to 5 years. The mechanisms and processes responsible for the selective loss of motor neurons are still unknown other than in rare cases of familial ALS, which occurs from mutations in the superoxide dismutase -1 gene that gives rise to toxicity from intracellular aggregates due to mutant superoxide dismutase-activity⁽¹⁾. Many theories of pathogenesis have been proposed - including oxidative stress, inflammation, glutamate-mediated excitotoxicity, axonal strangulation from cytoskeletal abnormalities, loss of trophic factor support, mitochondrial dysfunction and abnormal protein aggregation-based on studies of human post mortem tissue, research on animal models, and in vitro work^(1, 2). Clinical trials have as yet failed to identify any truly effective therapies in ALS, with only riluzole, an inhibitor of neuronal glutamate release, providing a modest improvement in survival^(1, 3). Ongoing trials are exploring the value of antiglutamatergic agents, including the cephalosporin antibiotic ceftriaxone, as well as antioxidants, anti-inflammatory agents⁽⁴⁾, mitochondrial enhancers and anti-apoptotic drugs. Gene therapy with neurotrophic factors will soon be in clinical trials⁽¹⁾.

In the past few years, neuronal stems and precursors can be isolated in vitro, thus allowing expansion and controlled differentiation of selective populations of neuronal cells⁽⁵⁾. Since then, research on stem cells has expanded greatly as a tool to develop potential therapies to treat incurable neurodegenerative diseases. Stem cell transplantation has been effective in several animal models, but the underlying restorative mechanisms are still unknown. Several mechanisms such as cell fusion, neurotrophic factor release, endogenous stem cell proliferation, and transdifferentiation may explain positive therapeutic results, in addition to replacement of cell loss⁽⁶⁾. In chimeric transgenic mice, Albert Clement and colleagues showed that SOD1 mutant neurons survived longer when surrounded by a wild-type environment. Damaged mutated glial and neuronal cells, therefore, could act in concert to provoke disease, in contrast with in mutant neurons in wild type environment, which failed to induce motor neuron degeneration⁽⁷⁾. Preliminary stem cell transplantation trials had already been performed in animal models⁽⁶⁾. Infusion of human umbilical-cord-blood mononuclear cells and bone-marrow stem cells substantially increased the lifespan of the SOD1G93A mouse in a dose dependent manner, although no human DNA was detected in the host tissues. Human umbilical-cord-blood cells, given intravenously to presymptomatic SOD1G93 mice, migrated preferentially towards degenerated neuronal sites, and to peripheral organs. An

overall neuroprotective effect was suggested as the cause of the observed benefits⁽⁷⁾. The recent breakthroughs in stem cell research might nevertheless provide possibilities for neural implantation and cell replacement therapy for patients with ALS⁽⁸⁾.

All are agreed that there is pressing need for an effective treatment for ALS. Such treatment may derive from a combination of therapeutic strategies aimed at different aspects of the disorder, and might include drugs directed at the initial, intermediate or terminal cascade of events leading to cell death, as well as the use of stem cells to replace dead motor neurons, or to protect those that remain⁽⁸⁾. Stem cell technology is at an early stage but the desperate need for a therapy in ALS patients may legitimize clinical trials in absence of conclusive scientific evidence⁽⁵⁾.

Based on these preclinical data, we conducted a controlled clinical trial to determine whether stem cell transfusion restores, slows, or even stops disease progression and whether it is a safe method that could be used in research for treatment of patients with ALS.

Methods

Patient population and study design

STEM-ALS was a pilot double-blind, parallel-group trial that enrolled patients from Siriraj Hospital. Patients were eligible for inclusion in the study if they were at least 18 years of age, had received a diagnosis of familial or sporadic ALS according to El Escorial World Federation of Neurology revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis⁽⁹⁾, were able to measure maximal voluntary isometric contraction (MVIC) for at least 4 out of 8 arm muscle groups (bilateral shoulders and elbows flexion and extension)⁽¹⁰⁾, and must had the symptoms for less than 5 years. A stable dose for at least 30 days of riluzole before baseline visit was allowed to continue the drug of that dose during trial. Numbers of patients enrolled and randomly assigned to each study groups were shown in Fig. 1. The inclusion and exclusion criteria were summarized in Table 1. The trial protocol was approved by the institutional ethic committee at Siriraj Hospital (SiEC number 175/2550). All patients or legally authorized representatives gave written informed consent before enrollment.

Randomization and intervention

At the screening visit, all newly-diagnosed ALS patients at Siriraj Hospital were advised regarding the trial and explained the study design. Eligible patients were randomly assigned, in a 2:1 ratio, to receive stem cell transfusion (SCT), via spinal angiogram, or placebo. All site

investigators, coordinators and clinical evaluators were blind to treatment assignment throughout the study. Bone marrow harvest from both iliac crests was performed in an operating room by trained investigational hematologist under generalized anesthesia. Stem cells from the 200 ml aspirated bone marrow (CD-34) were extracted and used as autologous stem cell transplantation. The extracted stem cell (20 ml) was then infused trans-angiographically via right femoral artery at an affected segment of spinal cord (anterior spinal artery) and/or brainstem (vertebral artery) in the intervention group. An equal volume of patient's plasma was infused in the placebo group.

Concomitant therapies

Treatment with riluzole after stem cell or plasma had been transfused was permitted, if the drug had been taken for at least 30 days before enrollment. However, other drugs were prohibited if they were currently being investigated for the efficacy in the treatment for ALS.

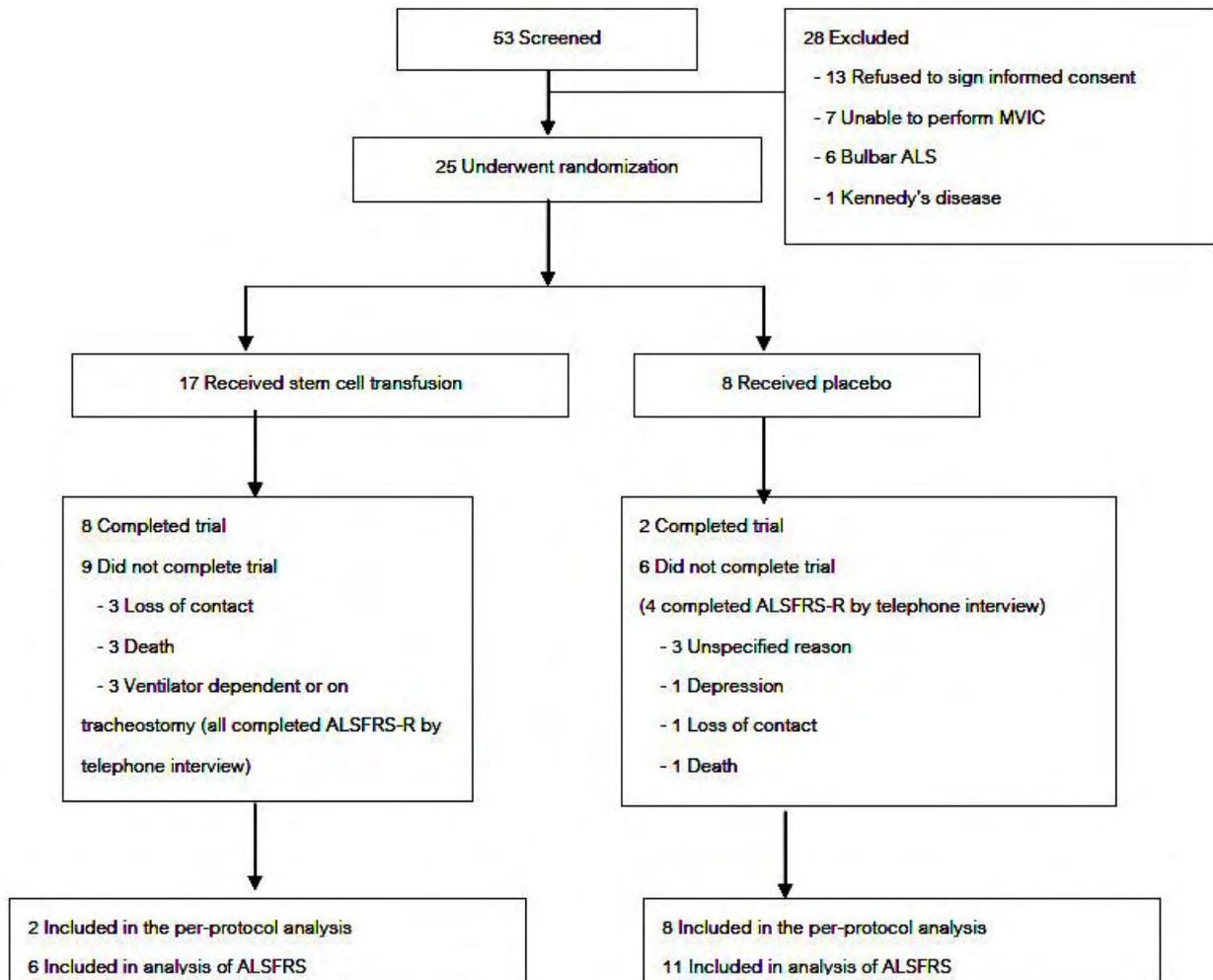


Figure 1. Numbers of patients, who were enrolled, randomly assigned to a study group, and included in the per-protocol population.

Table 1. Inclusion and Exclusion criteria

Inclusion criteria

1. Age, 18 years or older
2. Diagnosis of familial or sporadic ALS
3. Able to measure maximal voluntary isometric contraction (MVIC) for at least 4 out of 8 arm muscle groups (bilateral shoulders and elbows flexion and extension)
4. Time of symptom onset less than 5 years before enrollment
5. A stable dose for at least 30 days of riluzole before baseline visit was allowed to continue the drug of that dose during trial

Exclusion criteria

1. Require ventilator support
2. Taken other investigational drugs
3. Patients with physical disability from other neurological or musculoskeletal disorders
4. End-stage organ failure, evidence of malignant diseases
5. Angiographic procedure was unable to be performed
6. Presence of intracranial or spinal cord tumor
7. Pregnancy
8. Unwilling to sign the informed consent

Clinical assessment

All enrolled patients were assessed by examiners, who were unaware of the treatment assignment. Assessments were made at baseline visit, 2, 4, 8, and 12 months after stem cell transfusion. Data on demographic information (age, sex, race), family history of ALS, concurrent anti-glutamatergic therapy (riluzole), time since symptom onset to enrollment, time since symptom onset to diagnosis given, affected part of body at disease onset (i.e., bulbar and limb onset) were collected at baseline visit. All included patients must have had screening CT or MRI to exclude silent central nervous system (CNS) tumor. Blood sample, taken for analysis of complete blood

count, serum electrolyte, blood urea nitrogen, creatinine, and coagulogram, and chest X ray were performed as a part of preoperative evaluation. Initial assessments included the maximal voluntary isometric contraction (MVIC), a standardized, validated measurement of muscle strength that was previously used in prior clinical trials in patients with ALS⁽¹⁰⁾. The baseline MVIC values were accessed from eight arm muscle groups (bilateral shoulder adduction and abduction, bilateral elbow flexion and extension), MVIC of ten leg muscle groups (bilateral hip flexion and extension, bilateral knee flexion and extension, bilateral ankle dorsiflexion), and MVIC of bilateral hand grip muscles. Examiner was trained and certified in the measurement of MVIC. We tested the MVIC of each muscle group for two times at the same visit, and chose the better raw score as the accounting score for that visit. ALS Functional Rating Scale-Revised (ALSFRRS-R), a 10-item scale, was used to measure the patient's functional ability in performing basic activities of daily living⁽¹¹⁾. Total scores on the ALSFRRS-R range from 0 to 40, with higher values reflecting more severe functional disability. Breathing capability was measured by %predicted forced vital capacity (FVC). In addition, the patient's clinical condition was monitored for the first 24 hours after angiographic procedure to observe any immediate procedural- and stem-cell-related adverse events. During the follow-up period, MVIC, ALSFRRS-R and %predicted FVC were performed at 2 months, 4 months, 8 months and 12 months after the treatment. Additional neuroimaging would be performed in case the study neurologist suspected an occurrence of CNS tumor⁽¹²⁾.

Outcome measures

The primary efficacy end point was the rate of decline in the arm muscle strength at month 12, as assessed by means of arm megascore, modified from arm megascore defined in other article (13), which was an average value of MVIC of the aforementioned eight arm muscle groups. Significant reduction in the rate of decline in muscle power was defined as a reduction of at least 30% slower in one treatment group than the other treatment group. The secondary efficacy end point included; 1.) the rate of decline in leg muscle strength at month 12, as assessed by means of leg megascore which was an average value of MVIC of the above ten leg muscle groups; 2.) the rate of decline in grip muscle strength at month 12, as assessed by means of grip megascore which was an average value of MVIC of the bilateral grip muscle; 3.) the rate of decline in %predicted FVC at month 12; 4.) survival outcome, as defined as death rate, tracheostomy, or permanent assisted ventilation, at month 12. Further functional end point was the rate of decline in ALSFRRS-R at month 12.

Safety end points included overall procedural- and stem-cell-transfusion related complications, and other serious adverse events.

Statistical analysis

The sample size was based on the expected average decline in arm megascore and standard deviation obtained from the recently reported trials of topiramate⁽¹³⁾, creatine⁽¹⁴⁾ and celecoxib (15) in ALS. Power analysis of these data showed that a cohort of 59 subjects per group studied for 12 months would have an 80% chance of detecting a 30% decrease in the rate of decline in arm megascore at a two-sided significance level of 0.05. In May 2009, after 25 patients had been enrolled, we decided to stop enrolling more cases with the reason of slow rate of case recruitment. With these small subjects, we might not have provided the efficacy difference, or a chance to detect any side effect that occurs less frequent than 5% per annum. The ratio of 2:1, with using computer-generated method, was chosen to enhance subject recruitment because this design would minimize the number of patients given placebo, and also provided more safety information on the use of SCT in patients with ALS for 12 months.

Based on the intent-to-treat principle, the data set for analysis included all randomized subjects. Analysis of primary and secondary outcome variables used analysis for repeated measures. For the analysis of mortality, survival curves were plotted using the method of Kaplan-Meier and test for a treatment effect using a log-rank test. The survival analysis is adjusted for baseline covariates using a Cox proportional hazards model.

Results

Enrollment and Baseline characteristics

Between August 2007 and April 2009, 25 patients with ALS were randomized to stem cell transplantation (n = 17) or placebo (n = 8). Due to increased patients disabilities and some patients became ventilator dependent, only 8 (47.1%) and 2 (25%) subjects completed all the MVIC tests and had %predicted FVC performed according to the protocol at 12-month follow-up visit in SCT group and placebo group, respectively. However, 11 (64.7%) and 6 (75%) subjects were able to complete the ALSFRS at 12-month follow up visit (interviewed via the telephone). Demographic data, clinical variables, and primary and secondary outcome variables at baseline showed no statistically significant differences between the two treatment groups (Table 2). However, the SCT group had trend to have higher arm megascore, grip megascore, and ALSFRS-R than did the placebo group (Table 2).

Table 2: Baseline patient characteristics

Variable	SCT (n = 17)	Placebo (n = 8)	p value
Age, yr	53.1 (8.4)	55.4 (10.3)	0.581
Male gender, %	70.6	62.5	0.819
Family history of ALS, %	0	0	n/a
Years since symptom onset, yr	2.3 (1.1)	2.0 (0.8)	0.402
Years since diagnosis, yr	1.5 (0.9)	1.1 (0.7)	0.282
Limb onset, %	82.4	87.5	0.896
Weight, kg	60.5 (12.7)	51.7 (15.6)	0.196
Taking riluzole, %	41.2	25	0.529
Arm megascore	14.7 (9.0)	9.1 (5.1)	0.062
Leg megascore	57.3 (35.1)	41.7 (30.3)	0.272
Grip megascore	12.3 (8.1)	6.0 (8.4)	0.099
ALSFRS-R score	27.8 (8.2)	22.6 (5.8)	0.086
FVC % predicted	45.6 (19.7)	51.0 (15.3)	0.585

Values are mean (SD) or %

SCT = stem cell transfusion; ALSFRS-R = ALS functional rating scale - Revised;

FVC = forced vital capacity.

Efficacy of stem cell transfusion

The per-protocol analysis showed that, at month 12, arm megascore as well as leg megascore, grip megascore, FVC percentage predicted, and ALSFRS-R declined at the non-significantly different rates (Table 3). There was also no difference in days to survival end, for which was defined as number of days from the procedure date to the death, tracheostomy or ventilator-dependent, and loss of contact date, and the all-cause mortality between the two groups (Table 4). Interestingly, in the SCT group declined at the lower rate than the placebo in ALSFRS-R at month 2, -0.5938 ± 0.247 vs. -2.1875 ± 0.605 , $p = 0.036$ (data not shown).

Table 3: Treatment effects

Outcome measure	SCT (units/mo)	Placebo (units/mo)	Slope difference	Percent difference	p value
Arm megascore (SE)	-0.7345 (0.141)	-0.5292 (0.371)	-0.2053	38.8	0.679
Leg megascore (SE)	-0.4981 (0.381)	-2.157 (0.819)	1.6585	76.9	0.251
Grip megascore (SE)	-0.7438 (0.148)	-0.633 (0.633)	-0.1104	17.4	0.891
FVC %predicted (SE)	-0.5525 (0.295)	-1.3067 (n/a)	0.7542	57.7	n/a
ALSFRS-R (SE)	-0.8409 (0.206)	-1.0139 (0.216)	0.1730	17.1	0.572

Values are shown as means (standard error)

SE = standard error; SCT = stem cell transfusion; FVC = forced vital capacity;
ALSFRS-R = ALS functional rating scale – Revised.

Table 4: Survival outcome

Survival outcome	Stem cell transfusion (n = 17)	Placebo (n = 8)	p value
Days to the survival end*	341.6 (24.3)	350.4 (35.2)	0.729
Mortality (%)	17.6	12.5	0.764

*included death, ventilator dependent, on tracheostomy, and loss to contact

Values are shown as means (standard error)

Adverse events

There were 8 (32%) incidences reported in both groups: a) SCT group (6 events) - paresthesia, vertigo, hypertension, and dyspepsia; and b) placebo group (2 events) - ecchymosis, and depression. Five of 8 subjects completed 12-month follow-up visit. The subject with depression, which developed at 8 months after the procedure date, did not complete the MVIC and %predicted FVC for the month-12 visit, but participated in the telephone interview for ALSFRS-R at 12 months. When compared between the groups, there was no difference in the total numbers of reported events in each group as well as the type of adverse events (Table 5). The two subjects with paresthesia - one below the 6th thoracic spinal level, and one in the right palm, developed the symptom within the session of stem cell transfusion and persisted throughout the study period with slight improvement with administration of antineuropathic medications. The two subjects with vertigo developed transient vertigo after the session of angiographic procedure with no other neurological deficits. Symptoms in both cases completely resolved within less than 24 hours. In one case, the brain imaging (computerized tomography (CT) and CT angiography) was performed and the results were within normal limits.

Table 5: Adverse events

Adverse event	Total occurrence (n = 25)	SCT (n = 17)	Placebo (n = 8)	p value
All events	8 (32)	6 (35.3)	2 (25)	0.771
Paresthesia	2 (8)	2 (11.8)	0 (0)	0.775
Vertigo	2 (8)	2 (11.8)	0 (0)	0.775
Hypertension	1 (4)	1 (5.9)	0 (0)	0.889
Dyspepsia	1 (4)	1 (5.9)	0 (0)	0.889
Ecchymosis	1 (4)	0 (0)	1 (12.5)	0.145
Depression	1 (4)	0 (0)	1 (12.5)	0.145

Values are shown as number (%)

SCT = stem cell transfusion

Discussion

Our double-blind, randomized, controlled, pilot study failed to demonstrate the beneficial effect of stem cell transfusion on any of the disease parameters measured at one year after the treatment in patients with pretracheostomy ALS. As far as adverse event is concerned, the prevalence of adverse effects in the treated patients was not significantly more than the control subjects. Therefore, although this study could not demonstrate benefits of stem cell transfusion via spinal angiographic procedure, the study could provide another option or approach to deliver stem cells to the target in treatment of patients with ALS.

Analyzing this negative result is still worthy and may help conduct the future research in this area. Several theories supported a potential effect of stem cell in treating ALS such as cell replacement, and neurotrophic factors. Data suggested microenvironment as a primary mechanism of how stem cells might have effects in ALS^(16, 17), since the surrounding glia can influence degeneration and death of motor neuron⁽¹⁷⁾ and therapeutic benefit was observed by replacing mSOD1 microglia with wild-type microglia in transgenic mSOD1 mice⁽¹⁸⁾. Other than this, neurotrophic factors production⁽¹⁹⁾ and stimulation of endogenous repair⁽²⁰⁾ may contribute to the effect. In human study, one small-sample, uncontrolled, pilot study on treatment with stem cell therapy in ALS showed the slow rate of motor and functional decline after treatment with stem cells⁽²¹⁾.

Given the potentiality of stem cell in treating ALS as discussed above, we have conducted our study to determine whether stem cell transfusion can restore or slow rate of decline in some of the measurements. Negative results in our study might have been attributable to, first, the small sample size. The calculated sample size based on the outcome measurement deterioration in previous studies of Topiramate⁽¹³⁾, Creatine⁽¹⁴⁾, and Celecoxib⁽¹⁵⁾ to detect the efficacy difference was at least 59 subjects. We had to stop enrolling new cases after two years due to slow recruitment rate. The therapeutic effect was therefore undetected. Second, the life span of stem cell in vivo might be limited. This was confirmed by the study of Keller and Snodgrass, which they reported that hemopoietic stem cell could function only for a period of the lifetime of a mouse⁽²²⁾. According to this result, the treatment effect might not be further observed if the effect of treatment was primarily generated by the production of neurotrophic factor. As seen in our result that showed the possible differential effect of stem cell demonstrated by slow rate of ALSFRS-R decline at 2 months in favor of the treatment. Third, the mean dose of total stem cell used in our study was 10.88×10^6 cells (range $0.89 \times 10^6 - 19.38 \times 10^6$ cells). This amount was lower than that of 57×10^6

(range 7×10^6 – 152×10^6 cells) in the study of Mazzini et al⁽²¹⁾, in which showed a positive result. Finally, we did not design the study to demonstrate the type and location of migration of differentiated cell; therefore, negative result was difficult to determine whether because of lack of treatment efficacy, or methodological technique.

Different approaches for stem cell administration have been used in various studies including direct intraspinal^(21, 23), intrathecal⁽²⁴⁾, and intravenous methods⁽²⁵⁾. Intra-arterial stem cell transfusion has been studied in several neurological and non neurological diseases; e.g. ischemic stroke⁽²⁶⁾, traumatic brain injury⁽²⁷⁾, peripheral arterial disease⁽³⁸⁾, and myocardial infarction⁽²⁹⁾, with the hope to increase cell engrafting in the pathologic tissues⁽²⁵⁾. In ALS, intravenously injected stem cells were found in the rat's central nervous system compared to wild-type brain representing ability of stem cells to migrate to the lesion⁽²⁵⁾. Moreover, in ALS, there was evidence of blood-brain barrier disruption and vascular abnormalities, which preceded motor symptoms⁽³⁰⁻³²⁾. Hence, spinal and/or cerebral (in case bulbar symptoms present) angiogram could have been selected as a potential route of stem cell administration.

Concerning the adverse events, neurological symptoms; i.e. paresthesia (2 patients) and central vertigo (1 patient) were noted in the stem cell transfusion group; however, the overall rate of adverse events was not significantly difference between the two groups. In addition, these events developed within hours after the transfusion; therefore, they might have rather been related to the angiographic procedure, than the effect of stem cell. In Mazzeni et al⁽²¹⁾, dysesthesia was found after intraspinal stem cell transplantation at the injected point for which the mechanism was likely the direct complication of procedure. In another study, transient loss of sensation in lower limbs following intrathecal stem cell injection was noted⁽²⁴⁾. However, in our cohort, the rate of neurological complications was higher than that was reported from normal angiographic procedure. In the study of Willinsky et al, neurological complications in 2,899 prospective cerebral angiographic procedures were reported 1.3 %⁽³³⁾ compared to 12% (3/25 events) in our study. The possibility was that the stem cell extract might have high viscosity, thus increasing the risk of transient CNS ischemia.

To our knowledge, the present study was the first study trying to address the efficiency of stem cell therapy administered via spinal and/or cerebral angiogram. Even though the result showed no benefit, no serious adverse event was observed. Therefore, this study could provide another approach to deliver stem cells to the target in treatment of ALS patients. Larger sample

size, perhaps multiple, and higher doses of stem cell transfusion along with determination of stem cell migration by using MRI tagging⁽³⁴⁾ may be helpful in the future research.

Acknowledgement

This study has been supported by The Thailand Research Fund. Dr. Isarakrisil, Dr. Pongvarin, and Dr. Chiewit report receiving grant support from The Thailand Research Fund. No other potential conflict of interest relevant this article was reported.

Narong is acknowledged for his assistance in the measurement of maximal voluntary isometric contraction. Yaowalak is acknowledged for her assistance in stem cell preparation. Researchers are very thankful to Department of anesthesiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Bangkok, Thailand for their cooperation in performing general anesthesia for all studied patients during the bone marrow harvest.

References

1. Goodall EF, Morrison KE. Amyotrophic lateral sclerosis (motor neuron disease): proposed mechanisms and pathways to treatment. *Expert Rev Mol Med* 2006; 8: 1-22.
2. Jackson M, Llado J, Rothstein JD. Therapeutic developments in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* 2002; 11: 1343-64.
3. Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *NEJM* 1994; 330: 585-91.
4. Cudkovicz ME, Shefner JM, Schoenfeld DA, et al. Trial of celecoxib in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2006; 60: 22-31.
5. Silani V, Fogh I, Ratti A, Sassone J, Ciammola A, Cova L. Stem cells in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2002; 3: 173-81.
6. Silani V, Corbo M. Cell-replacement therapy with stem cells in neurodegenerative diseases. *Curr Neurovasc Res* 2004; 1: 283-9.
7. Silani V, Cova L, Corbo M, Ciammola A, Polli E. Stem-cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 2004; 364: 200-2.
8. Silani V, Leigh N. Stem cell therapy for ALS: hope and reality. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2003; 4: 8-10.
9. Brooks B. El Escorial Revisited: Revised Criteria for the Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Three-day workshop of World Federation of Neurology Research Committee on Motor Neuron Diseases. www.wfnals.org.com.
10. Andres PL, Thibodeau LM, Finison LJ, Munsat TL. Quantitative assessment of neuromuscular deficit in ALS. *Neurol Clin* 1987; 5: 125-41.
11. Cedarbaum J. The amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale (ALSFRS). *Arch Neurol* 1996; 53: 141-7.
12. Le Belle JE, Svevendsen CN. Stem cells for neurodegenerative disorders: where can we go from here?. *BioDrugs* 2002; 16: 389-401.
13. Cudkovicz ME, Shefner JM, Schoenfeld DA, et al. A randomized, placebo-controlled trial of topiramate in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 2003; 61: 456-64.
14. Shefner JM, Cudkovicz ME, Schoenfeld DA, et al. A clinical trial of creatine in ALS. *Neurology* 2004; 63: 1656-61.

- 15.Cudkowicz ME, Shefner JM, Schoenfeld DA, et al. Trial of celecoxib in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2006; 60: 22-31.
- 16.Borchelt DR. Amyotrophic lateral sclerosis - are microglia killing motor neurons? *N Engl J Med* 2006; 12: 1611-3.
- 17.Clement AM, Nguyen EA, Roberts ML, et al. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 2003: 113-7.
- 18.Beers DR, Henkel JS, Xiao Q, et al. Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 16021– 6.
- 19.Klein SM, Behrstock S, McHugh J, et al. GDNF delivery using human neural progenitor cells in a rat model of ALS. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 509–21.
- 20.Chi L, Ke Y, Luo C, et al. Motor neuron degeneration promotes neural progenitor cell proliferation, migration and neurogenesis in the spinal cords of ALS mice. *Stem Cells* 2005; 24: 34–43.
- 21.Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, et al. Stem cell treatment in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 2008; 265: 78–83.
- 22.Keller G and Snodgrass R. Life span of multipotential hematopoietic stem cells in vivo. *J Exp Med* 1990; 171: 1407-18.
- 23.Kodaa M, Okadad S, Nakayama T, et al. Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice. *Neuroreport* 2005; 16: 1763-7.
- 24.Janson CG, Ramesh TM, During MJ, Leone P, and Heywood J. Human intrathecal transplantation of peripheral blood stem cells in amyotrophic lateral sclerosis. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10: 913-15.
- 25.Mitrecić D, Nicaise C, Gajović S, and Pochet R. Distribution, differentiation, and survival of intravenously administered neural stem cells in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Transplant* 2010; 19: 537-48.
- 26.Chua JY, Pendharkar AV, Wang N, et al. Intra-arterial injection of neural stem cells using a microneedle technique does not cause microembolic strokes. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2011; 31: 1263-71.
- 27.Lundberg J, Le Blanc K, Söderman M, Andersson T, and Holmin S. Endovascular transplantation of stem cells to the injured rat CNS. *Neuroradiology* 2009; 51: 661–7.
- 28.Ruiz-Salmeron R, de la Cuesta-Diaz A, Constantino-Bermejo M, et al. Angiographic demonstration of neoangiogenesis after intra-arterial infusion of autologous bone marrow

mononuclear cells in diabetic patients with critical limb ischaemia. *Cell Transplant* 2011; doi: 10.3727/096368910X564526.

29. Assmus B, Honold J, Schächinger V. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355:1222-32.
30. Zhong Z, Deane R, Ali Z. ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nature Neurosci* 2008; 11: 420-2.
31. Leonardi A, Abbruzzese G, Arata L, Cocito L, and Vische M. Cerebrospinal fluid (CSF) findings in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 1984; 231: 75-8.
32. Garbuzova-Davis S, Saporta S, Haller E, et al. Evidence of compromised blood-spinal cord barrier in early and late symptomatic SOD1 mice modeling ALS. *PLoS One* 2007; 2: 1205.
33. Willinsky R, Taylor SM, terBrugge K, Farb RI, Tomlinson G, and Montanera W. Neurologic complications of cerebral angiography prospective analysis of 2,899 procedures and review of the literature. *Radiology* 2003; 227: 522-8.
34. Modo M, Cash D, Mellodew K. Tracking transplanted stem cell migration using bifunctional, contrast agent-enhanced, magnetic resonance imaging. *NeuroImage* 2002;17: 803-11.

**A RANDOMIZED, DOUBLE-BLIND, PLACEBO-CONTROLLED TRIAL OF GRANULOCYTE COLONY
STIMULATING FACTOR (G-CSF) FOR THE TREATMENT OF ACUTE ISCHEMIC STROKE**

YONGCHAI NILANONT, MD¹, SANSERN LIMSOONTARAKUL, MD¹, CHULALUK KOMOLTRI, DRPH², PIPAT
CHIEWIT, MD³, SURAPOL ISARAGRISIL, MD⁴, NIPHON POUNGVARIN, MD, FRCP, FRI¹

¹DIVISION OF NEUROLOGY, DEPARTMENT OF MEDICINE, FACULTY OF MEDICINE SIRIRAJ HOSPITAL,
MAHIDOL UNIVERSITY, BANGKOK, THAILAND, ²DEPARTMENT OF RESEARCH DEVELOPMENT, FACULTY OF
MEDICINE SIRIRAJ HOSPITAL, MAHIDOL UNIVERSITY, BANGKOK, THAILAND, ³DEPARTMENT OF RADIOLOGY,
FACULTY OF MEDICINE, SIRIRAJ HOSPITAL, BANGKOK, THAILAND, ⁴DIVISION OF HEMATOLOGY,
DEPARTMENT OF MEDICINE, FACULTY OF MEDICINE SIRIRAJ HOSPITAL, MAHIDOL UNIVERSITY, BANGKOK,
THAILAND,

WORD COUNT: ABSTRACT: 250, TEXT: 1869, 1 TABLE, 17 REFERENCES

CORRESPONDING AUTHOR:

YONGCHAI NILANONT, MD

DIVISION OF NEUROLOGY, DEPARTMENT OF MEDICINE,
FACULTY OF MEDICINE, SIRIRAJ HOSPITAL, MAHIDOL UNIVERSITY,
BANGKOK, THAILAND, 10700,

TEL: +662 419-7101; FAX: +662 412-3009

EMAIL ADDRESS: SIYSL@MAHIDOL.AC.TH